

BEST AVAILABLE COPY

Rec'd T/PTO 09 FEB 2005

PCT/JP 03/01475

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

13.02.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日
Date of Application:

2002年 8月12日

出 願 番 号
Application Number:

特願2002-235029

[ST.10/C]:

[JP 2002-235029]

出 願 人
Applicant(s):

滋賀医科大学長

REC'D 11 APR 2003

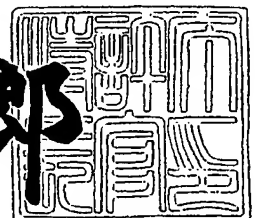
WIPO PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 3月25日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3020614

【書類名】 特許願

【整理番号】 NP02-1074

【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特
許出願

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G12N 15/09

【発明者】

 【住所又は居所】 滋賀県草津市笠山 7 丁目 3 番 D - 3 0 1 号

 【氏名】 佐藤 浩

【発明者】

 【住所又は居所】 滋賀県大津市南郷 2 丁目 4 - 1 - 2 2

 【氏名】 藤山 佳秀

【発明者】

 【住所又は居所】 滋賀県栗東市小平井 2 4 - 8

 【氏名】 山本 和雄

【特許出願人】

 【持分】 010/010

 【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田月輪町

 【氏名又は名称】 滋賀医科大学長

【代理人】

 【識別番号】 100088904

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 庄司 隆

 【電話番号】 03-3864-6572

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 067070

 【納付金額】 0円

【その他】 国以外の全ての者の持分の割合 0 / 1 0

【提出物件の目録】

【物件名】	明細書	1
【物件名】	図面	1
【物件名】	要約書	1
【プルーフの要否】	要	

【書類名】 明細書

【発明の名称】 グルクロン酸転移酵素遺伝子の変異解析による薬剤代謝活性の予測方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ（UGT）をコードする遺伝子のエキソン5領域の変異を検出する工程を含むことを特徴とするUGTの薬剤代謝能に対する検査方法。

【請求項2】 プロモーター領域の変異を検出する工程を含む請求項1に記載の検査方法。

【請求項3】 UGT1をコードする遺伝子を含む試料を、UGT1A1、UGT1A3、UGT1A4、UGT1A5、UGT1A6、UGT1A7、UGT1A8、UGT1A9およびUGT1A10の各アイソフォーム毎の検査をすることなく、該各アイソフォームに共通の核酸配列を有するエキソン5領域の変異を検出する工程を含む請求項1または2に記載の検査方法。

【請求項4】 UGT1A1分子のアミノ酸配列486番目のアミノ酸をコードするUGT遺伝子配列の1456番目の塩基に対応するUGT1A分子の各アイソフォームのエキソン5領域の変異を検出する工程を含む請求項3に記載の検査方法。

【請求項5】 上記変異の検出工程とともに、UGT分子をコードする遺伝子配列のエキソン1、2、3および4の領域の少なくとも1つの領域の変異を検出する工程を含む請求項1～4のいずれか1に記載の検査方法。

【請求項6】 UGT1A1分子のアミノ酸配列71番目のアミノ酸をコードするUGT遺伝子配列の226番目の変異およびアミノ酸配列229番目のアミノ酸をコードする遺伝子配列の486番目の変異のうち少なくとも1つの遺伝子配列の変異を検出する工程を含む請求項5に記載の検査方法。

【請求項7】 請求項3または4に記載の塩基置換からなる変異を有するUGT遺伝子または該変異を含む遺伝子の断片。

【請求項8】 請求項1～6のいずれか1に記載の塩基置換の検出方法に供される被検DNAとしての機能的有効長を有するDNA断片または請求項1～6に

記載の塩基置換を検出方法に使用するためのプローブとしての機能的有効長を有するDNA断片。

【請求項 9】 配列番号 1～3 のいずれか 1 で表される塩基配列を有する UGT に特異的なオリゴヌクレオチドプローブである請求項 7 または 8 記載の DNA 断片。

【請求項 10】 配列番号 1 で表される塩基配列を有するプローブと配列番号 2 および／または 3 で表される塩基配列を有するプローブを組み合わせる請求項 5 または 6 に記載の検査方法。

【請求項 11】 請求項 7～9 のいずれか 1 に記載のオリゴヌクレオチドプローブまたは請求項 10 に記載の方法に用いるオリゴヌクレオチドプローブを同一の装置内に設置した検出装置。

【請求項 12】 請求項 7～9 のいずれか 1 に記載のオリゴヌクレオチドプローブの塩基配列の末端が、官能基を介して不溶性支持体に結合して固定化されている核酸チップまたは核酸アレイである請求項 11 記載の検出装置

【請求項 13】 請求項 11 または 12 に記載の装置を用いて薬剤代謝を判定、予測または検査する方法。

【請求項 14】 請求項 1～6、10、13 のいずれか 1 に記載の方法に用い、または請求項 7～9 に記載の核酸断片或いは請求項 11 または 12 に記載の装置を組み込んだ検査キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は臨床検査の分野で用いられ、とりわけグルクロン酸抱合に関与する酵素の遺伝子検査の方法およびそのためのプローブおよびキットに関する。

【0002】

【従来の技術】

ウリジンジホスフェートグルクロノシルトランスフェラーゼ (UDP-glucuronosyltransferase, UGT) は種々の薬剤のグルクロン酸抱合を触媒する酵素である。UGT はそのアミノ酸配列の相同性により UGT 1 と UGT 2 の 2 つのファ

ミリーに分類される。

UGT1には、UGT1A1およびUGT1A3～UGT1A10の少なくとも9個のアイソフォームが存在する事が知られている。例えば、UGT1A1はビリルビン、アミン、フェノールなどを抱合し、UGT1A6は平面状の分子構造をもつフェノールを抱合する。ヒトUGT1遺伝子(UGT1)は染色体2q37に存在しており、アイソフォーム(1A1～1A10)ごとに基質特異性のあるエキソン1と、各アイソフォームで共通のエキソン2～5からなり、各エキソン1の上流にTATAboxを含むプロモーター領域が存在する。それぞれのアイソフォームは第1エキソン群の少なくとも9のうちの1つによりコードされるユニークなアミノ末端領域と4つのエキソンによってコードされる共通のカルボキシ末端領域を持っている。したがって、

一方UGT2は臭気物質を抱合するUGT2Aと胆汁酸、ステロイドを抱合するUGT2のサブファミリーに分けられる。

【0003】

血清ビリルビンが高値となる以外に一般肝機能検査に異常がなく、明らかな黄疸の原因(溶血所見など)を認めないものを体質性黄疸と称し、間接(非抱合型)ビリルビンが上昇するCrigler-Najjar症候群I型、同II型およびGilbert症候群と、直接(抱合型)ビリルビンが上昇するDubin-Johnson症候群、Rotor症候群とに大別される。Crigler-Najjar症候群I型、同II型およびGilbert症候群ではUGT1A1遺伝子のエキソン5での変異が報告されている。具体的にはアミノ酸配列番号486番目のチロシンがアスパラギン酸に置換した変異(Y486D)により、その酵素活性が正常のものに比べて13分の1に低下する。

【0004】

一方、体内での薬剤代謝に関与する物質として、チトクロームP450が良く知られている。そしてこの酵素の多型の違いにより、ある特定の薬剤が代謝されない、薬剤代謝異常が引き起こされることもよく知られている。薬剤の代謝異常はチトクロームP450の多型によるのみならず、上述のごとく薬剤がグルクロン酸抱合されて代謝されることから、薬剤代謝にUGTの多型の関与が知られるようになった。しかしながら、種々の薬剤代謝とUGTの多型との関係において

、数多くの薬剤に対する代謝を反映しうる有効な遺伝子の変異は明らかでない。
とりわけUGT 1 遺伝子のエキソン 5 領域の変異と薬剤代謝の関連は明らかでない。

【 0 0 0 5 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、UGT をコードする遺伝子の変異を効率的に検出することにより、薬剤代謝の判定、予測または検査方法を提供することである。

【 0 0 0 6 】

【課題を解決する手段】

本発明者らは鋭意研究を重ねた結果、UGT をコードする遺伝子が 5 個のエキソンから成り、エキソン 2 ～ 5 領域はUGT 1 のアイソフォーム毎に共通の領域であることから、これらの領域の変異を調べると、UGT 1 のアイソフォーム毎の検査をすることなく、UGT 1 の変異を有効的に検出しうることに着目し、とりわけUGT 1 分子のエキソン 5 領域の変異を検出することで、薬物代謝の予測が有効になされることを見出し、本発明を完成するに至った。

【 0 0 0 7 】

すなわち本発明は、

1. UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ (UGT) をコードする遺伝子のエキソン 5 領域の変異を検出する工程を含むことを特徴とするUGTの薬剤代謝能に対する検査方法、
2. プロモーター領域の変異を検出する工程を含む前項 1 に記載の検査方法、
3. UGT 1 をコードする遺伝子を含む試料を、UGT 1 A 1、UGT 1 A 3、UGT 1 A 4、UGT 1 A 5、UGT 1 A 6、UGT 1 A 7、UGT 1 A 8、UGT 1 A 9 およびUGT 1 A 1 0 の各アイソフォーム毎の検査をすることなく、該各アイソフォームに共通の核酸配列を有するエキソン 5 領域の変異を検出する工程を含む前項 1 または 2 に記載の検査方法、
4. UGT 1 A 1 分子のアミノ酸配列 4 8 6 番目のアミノ酸をコードするUGT 遺伝子配列の 1 4 5 6 番目の塩基に対応するUGT 1 A 分子の各アイソフォームのエキソン 5 領域の変異を検出する工程を含む前項 3 に記載の検査方法、

5. 上記変異の検出工程とともに、UGT分子をコードする遺伝子配列のエキソン1、2、3および4の領域の少なくとも1つの領域の変異を検出する工程を含む前項1～4のいずれか1に記載の検査方法、
6. UGT1A1分子のアミノ酸配列71番目のアミノ酸をコードするUGT遺伝子配列の226番目の変異およびアミノ酸配列229番目のアミノ酸をコードする遺伝子配列の486番目の変異のうち少なくとも1つの遺伝子配列の変異を検出する工程を含む前項5に記載の検査方法、
7. 前項3または4に記載の塩基置換からなる変異を有するUGT遺伝子または該変異を含む遺伝子の断片、
8. 前項1～6のいずれか1に記載の塩基置換の検出方法に供される被検DNAとしての機能的有効長を有するDNA断片または前項1～6に記載の塩基置換を検出方法に使用するためのプローブとしての機能的有効長を有するDNA断片、
9. 配列番号1～3のいずれか1で表される塩基配列を有するUGTに特異的なオリゴヌクレオチドプローブである前項7または8記載のDNA断片。
10. 配列番号1で表される塩基配列を有するプローブと配列番号2および／または3で表される塩基配列を有するプローブを組み合わせて使用する前項5または6に記載の検査方法、
11. 前項7～9のいずれか1に記載のオリゴヌクレオチドプローブまたは請求項10に記載の方法に用いるオリゴヌクレオチドプローブを同一の装置内に設置した検出装置。
12. 前項7～9のいずれか1に記載のオリゴヌクレオチドプローブの塩基配列の末端が、官能基を介して不溶性支持体に結合して固定化されている核酸チップまたは核酸アレイである前項11記載の検出装置
13. 前項11または12に記載の装置を用いて薬剤代謝を判定、予測または検査する方法。
14. 前項1～6、10、13のいずれか1に記載の方法に用い、または前項7～9に記載の核酸断片或いは前項11または12に記載の装置を組み込んだ検査キット、からなる。

【0008】

【本発明の実施態様】

本発明を詳細に説明するため、実施態様を例示して説明する。

2-アミノ-5-ニトロ-4-トリフルオロメチルフェノールグルクロン酸抱合物は強い肝毒性を有する前立腺癌の治療に使われる非ステロイド系の抗男性ホルモン剤であるフルタアミドの主な代謝物である。

2-アミノ-5-ニトロ-4-トリフルオロメチルフェノールはUGTによってグルクロン酸抱合される。UGT1A1およびUGT1A6の各アイソフォームの酵素によりグルクロン酸抱合されるとき酵素反応学的な反応を、それぞれ正常な分子とY486Dの変異をもつ分子で比較した。その結果、UGT1A1の変異型では天然型の最大速度に比べて約12%の最大速度を示し、Km値は2-アミノ-5-ニトロ-4-トリフルオロメチルフェノールに対しては約半分であり、UDP-グルクロン酸に対しては天然型と同等であった。一方UGT1A6については変異型は天然型の1%以下の活性しか示さず、最大反応速度、Kmの測定はともに不可能なレベルであった。

前述のようにUGT1遺伝子がアイソフォーム毎に共通のエキソン2～5領域とアイソフォーム毎に異なるエキソン1領域を有することから、共通エキソン領域に変異が起きるとすべてのアイソフォームにおいてUGT1の酵素活性が低下するといえる。

【0009】

本発明は、共通エキソン領域の変異を調べることで、UGT1に存在するアイソフォームの全てを対象に、遺伝子の変異を効率的に検査する方法を提供するものである。具体的には、例えばUGT1A1およびUGT1A6のエキソン5領域の変異(Y486D)を検査することにより、これらの酵素による薬物代謝を予測することができる。

さらに本発明は、UGT1のエキソン1領域の変異検出を加えることにより、各アイソフォームに固有の変異を検出し、それらを組み合わせることで、総合的にUGT遺伝子の変異の検出漏れの頻度を低減可能とするUGT遺伝子の変異検査方法が提供される。このことにより、薬剤代謝の予測、検査を効率的に行う方法が提供できる。

【0010】

本発明は、UGT1A1のエキソン5領域の変異、具体的にはY486D変異の検査方法を開示するもので、該検査方法により、同時に起きている他のアイソフォームの変異も検出し得る。例えば、UGT1A3、UGT1A4並びにUGT1A5の変異であるY487D、UGT1A6の変異であるY485D、およびUGT1A7、UGT1A8、UGT1A9並びにUGT1A10の変異であるY483D等を同一のプローブおよび／または同一の装置を使用して検査することができる。したがって、本発明の方法により、薬剤代謝に重要な働きをしているUGT1Aの各アイソフォームの変異を個々に検査することなく、1種の核酸プローブを用いることによって、これらアイソフォームの全てのエキソン5領域の変異を検出でき、その酵素活性の低下による薬剤代謝の判定、予測または検査を行うことが可能になる。

【0011】

本発明において、検出すべき遺伝子変異が明らかにされ、これが特定されているので、本発明の開示に従えば、その検出のための方法を適宜採用しもしくは該方法を適宜修飾して採用することは当業者であれば容易である。例えば、被験者のUGT遺伝子を対象として、本発明の特定の変異（Y486D変異）の検出は、当該変異位置を含む塩基配列を解析する各種の方法に従うことができる。これには、例えばサザンハイブリダイゼーション法、ドットハイブリダイゼーション法（J. Mol. Biol., 98: 503-517, 1975等参照）、ジデオキシ塩基配列決定法、DNAの増幅手法を組合せた各種の検出法〔例えばPCR-制限酵素断片長多型分析法（RFLP: Restriction fragment length polymorphism）、PCR-単鎖高次構造多型分析法（Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 86: 2766-2770, 1989等参照）、PCR-特異的配列オリゴヌクレオチド法（SSO: Specific sequence oligonucleotide）、PCR-SSOとドットハイブリダイゼーション法を用いる対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド法（Nature, 324: 163-166, 1986等参照）〕等を例示することができる。さらにオリゴヌクレオチドプローブを用いる核酸チップまたは核酸アレイによって簡便に検出することも可能である。

【0012】

(プローブ)

UGT 1 分子をコードする遺伝子のエキソン 1 内 2 2 6 番目の核酸塩基の変異 (G 7 1 R)、エキソン 1 内 6 8 6 番目の核酸塩基の変異 (P 2 2 9 Q) の変異およびエキソン 5 内 1 4 5 6 番目の核酸塩基の変異 (Y 4 8 6 D) は、核酸プローブを用いて検出することができる。

これらの核酸プローブ用の DNA 断片のヌクレオチド数は、少なくとも 8 個、通常 1 0 ～ 5 0 個、好ましくは 1 5 ～ 3 5 個の範囲にあるのがよい。プローブのヌクレオチド数が上記よりあまりに多くなりすぎると、1 本鎖 DNA にハイブリダイズしにくくなり、逆にあまりに小さすぎると、ハイブリダイゼーションの特異性が低下する。

【 0 0 1 3 】

具体的には、G 7 1 R 変異検出用プローブとして、(配列番号 2) T C A G A G A C N G A G C A T T T T の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、P 2 2 9 Q 変異検出用プローブは (配列番号 3) T A A T T C C C N G T A T G A A A の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、そして Y 4 8 6 D 変異検出プローブは (配列番号 1) T G G T A C C A G N A C C A T T C C T の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを使用することができる。この場合において、N は A, T, C または G の何れかもしくはイノシン等のユニバーサル塩基である。

また、これらのオリゴヌクレオチドの末端には、必要な化学物質、例えば核酸アレイ調製時のスポッティングを容易にするための物質や、各種標識物質などを付加することができる。

【 0 0 1 4 】

さらに本発明においては、UGT 遺伝子検出用プローブとして機能し得るものであれば、上記配列番号 1 ～ 3 に表される塩基配列を有する DNA 断片に限定されず、鋳型鎖との間に少数のミスマッチがあっても良い。例えば、上記機能を有するものであれば、配列番号 1 ～ 3 に表される塩基配列に例えば 2 個以下のヌクレオチドの置換、欠失および／または付加による修飾のなされた配列を包含することができる。

【 0 0 1 5 】

上記本発明で用いるプローブの各オリゴヌクレオチドは、常法に従い、自動合成機、例えばDNAシンセサイザー（パーキンエルマー社）等を用いて容易に合成することができ、得られるオリゴヌクレオチドは更に必要に応じて、市販の精製用カートリッジ等を用いて精製することもできる。合成オリゴヌクレオチドはスライドガラス表面に固定化した核酸アレイへ応用する場合には5'末端をアミノ標識しておくことも好適である。

【0016】

（核酸アレイ）

上記の各プローブはスライドガラス等の表面に固定化して核酸アレイ（一般には、「マイクロアレイ」ともいう。）として用いることができる。核酸アレイの手法は、公知の方法を適用することができ、特にその方法は限定されない（例えば遺伝子工学実験ノート下、羊土社、175-187（2002））。例えば、市販のアレイヤー、Affymetrix 417 Arrayerを用いてアミノシランコートしたスライドガラス上にスポットして調製することができる

【0017】

（対象試料と検査試料の調製）

本発明の方法により、医薬品開発における動態試験において重要な位置を占めるグルクロン酸抱合による薬物代謝を容易に判定することができる。これにより、投与される医薬品の代謝の適否を判定することができる。測定の対象となる試料は生体試料であれば良く、特に限定されないが、例えば肝臓、腎臓、白血球、毛髪等の臓器、組織等が挙げられる。測定試料において、UGT遺伝子の発現量が少ない場合には、対象とする核酸をPCR法、LAMP法、LCR法、NASBA法等の適当な増幅方法により増幅させた試料を測定することも可能である。

【0018】

検査対象試料からDNAを抽出し、変異を検出しようとする領域に特異的なプライマー対を用いて例えばPCR法によりDNAを増幅させて検査試料を調製することができる。具体的には、5'末端を蛍光標識したプライマー（例えば、5'-Cy3標識オリゴDNA）を用いて蛍光標識試料を調製することにより、調製した試料を核酸アレイ上のプローブとハイブリサイズさせて直接そのハイブリ

サイズした結果を検出することができる。

【 0 0 1 9 】

試料調製のためのプライマーとして、例えば以下のものを使用することができる。これにより、DNAを増幅させて蛍光標識試料を調製できる。

1) 変異検出部位 G 7 1 R 用のプライマー対：

G 7 1 R - F

(CTGCAGCAGAGGGGACATGA) (配列番号 4)

Cy 3 - G 7 1 R - R

(Cy 3 - AACATTATGCCCGAGACTAAC) (配列番号 5)

2) 変異検出部位 P 2 2 9 G 用プライマー対：

P 2 2 9 Q - F

(CAACCCATTCTCCTACGTG) (配列番号 6)

Cy 3 - P 2 2 9 G - R

(Cy 3 - AGATGCAGAGCTCAATAGGTC) (配列番号 7)

3) 変異検出部位 Y 4 8 6 D 用プライマー対

a) Y 4 8 6 D - F

(GCTGGACCTGGCAGTGTTTC) (配列番号 8)

Cy 3 - Y 4 8 6 D - R

(Cy 3 - TTTCCGGTAGCCATATGCACA) (配列番号 9)

b) Y 4 8 6 D - F 2

(CCGCAGCCCACGACCTCACCTGGT) (配列番号 10)

Cy 3 - Y 4 8 6 D - R 2

(Cy 3 - AGAGGAAACCAATCACGTCCAAGG)

(配列番号 11)

【 0 0 2 0 】

(検出)

上記の核酸アレイ蛍光標識の検出には市販の検出装置が用いられる。例えば Affymetrix 428 Array Scanner を用いて、スキャンニングして各スポットの蛍光シグナルを検出することができる。

【 0 0 2 1 】

(対象薬剤)

本発明の方法によって検査されうる対象となる薬剤は、UGTによりグルクロン酸抱合されるものであれば、その代謝の検査に有用である。これらの薬剤の例として、スピロノラクトン等の利尿剤、アセトアミノフェン、アスピリン、フロクタフェニン、インドメタシン等の鎮痛剤、ハロペリドール、カルピプラミン、ロラゼパム、アモキシサン等の向精神薬、モルヒネ、プロポフォール、アヘン等の麻酔鎮痛剤、抗癌剤の塩酸ドキソルピジン、鎮咳剤のリン酸コデイン、喘息治療薬の硫酸オルシプレナリン、抗てんかん剤のフェニトイン、抗ヒスタミン剤のフマル酸ケトチフェン、降圧および狭心症治療薬のカルベジロール、塩酸プロプラノロール等、脂質代謝改善剤のクロフィブラートアルミニウム、アルツハイマー治療薬の塩酸ドネペジル等が挙げられる。

【 0 0 2 2 】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【 0 0 2 3 】

【実施例 1】

(核酸アレイの調製)

配列番号 1 から 1 2 の各配列を持つ 5' アミノ修飾オリゴヌクレオチドを合成し、Affymetrix 417 Arrayer を用いて、アミノシランコートしたスライドガラス（シグマ社製）の表面にスポッティングし DNA チップを調製した。各オリゴヌクレオチドを 5 個ずつスポットした。調製したアレイのスポットレイアウトを図 1 に示した。

【 0 0 2 4 】

【実施例 2】

(試料の調製)

7 種類の検査試料を以下の 5' -Cy3 標識オリゴヌクレオチドと未標識オリゴヌクレオチドプライマーを用いて PCR 増幅させ、蛍光標識試料を調製した。

変異検出部位 G71R 用のプライマー対として、G71R-F と Cy3-G71R-R を用いて 150 塩基対の PCR 増幅産物を、変異検出部位 P229G 用プライマー対、P229Q-F と Cy3-P229G-R を用いて 195 塩基対の PCR 増幅産物を、さらに変異検出部位 Y486D 用プライマー対、Y486D-F と Cy3-Y486D-R を用いて 187 塩基対の PCR 増幅産物を得た。PCR の条件は以下のとおりである。

【0025】

反応容量 : 100 μ L
 テンプレート : 検査試料 1 μ L
 プライマー : 各 20 pmol
 使用酵素 : Ex Taq
 反応条件 : 94℃-30秒
 55℃-30秒
 72℃-30秒
 35 サイクル

反応物はエタノール沈殿法により精製した。

【0026】

【実施例 3】

(ハイブリダイゼーションおよび検出)

実施例 2 で調製した各試料を 12 μ L のハイブリダイゼーション緩衝液 [4×SSC (0.15 mol/L の NaCl と 15 mmol/L のクエン酸ナトリウムを基本溶液として 4×はその 4 倍濃度を表す)、0.2% SDS、50%ホルムアミド] に溶解し、その 10 μ L を実施例 1 で作成した核酸アレイに 42℃で 2 時間ハイブリダイズさせた。ハイブリダイズ後、緩衝液 (2×SSC、0.2% SDS) で 37℃、5 分間洗浄後さらに、緩衝液 (0.2×SSC) で室温、5 分間洗浄後、乾燥し、Affimetrix 428 Array Scanner を用いて蛍光シグナルを検出した。その結果を図 2～8 に示した。

【0027】

試料 1 では、G71R の変異検出チップの G 列のみに、P229Q 変異検出チ

チップのC列のみに、さらにY 4 8 6 Dの変異検出チップのT列のみにそれぞれハイブリダイズが観察された。これは、何れも正常な配列を有していることを示していた（図2）。

【0028】

試料2および3では、P 2 2 9 Qの変異検出チップのC列およびY 4 8 6 Dの変異検出チップのT列にハイブリダイズが認められ、それぞれ正常な配列が認められたが、G 7 1 Rの変異検出チップのA列およびG列の両方にハイブリダイズが観察された。これにより、G列にハイブリダイズする正常な配列と、A列にハイブリダイズする変異配列を共に有するヘテロ接合性の変異が確認された（図3、図4）。

【0029】

試料4においては、P 2 2 9 QおよびY 4 8 6 Dの変異検出チップでは何れも正常なハイブリダイズパターンを示したが、G 7 1 Rの変異検出チップのA列のみにハイブリダイズが観察された。これにより、ホモ接合性の変異が確認された（図5）。

【0030】

試料5では、G 7 1 RおよびY 4 8 6 Dの変異検出チップのハイブリダイズパターンは何れも正常であったが、P 2 2 9 Qにおいては正常なハイブリダイズであるC列とさらにA列にもハイブリダイズが観察された。これにより、ヘテロ接合性の変異が確認された（図6）。

【0031】

試料6ではG 7 1 RおよびP 2 2 9 Qの変異検出チップに対しては何れも正常なハイブリダイズパターンを示したが、Y 4 8 6 Dの変異検出チップに対しては、正常なハイブリダイズであるT列と変異を示すG列の両方にハイブリダイズが観察された。これにより、ヘテロ接合性の変異が確認された（図7）。

【0032】

試料7では試料6と異なり、Y 4 8 6 D変異検出チップにおいてG列のみにハイブリダイズが観察された。これにより、ホモ接合性の変異が確認された（図8）。

【0033】

以上7種の試料と同じ遺伝子配列を持つUGT分子を遺伝子組換えにより調製し、ビリルビンを基質として測定したときのUGT活性と上記の結果を比較検討した結果、表1のようになり、UGT分子をコードするエキソン5領域の変異、とりわけY486Dの変異を検出することにより、UGT分子の酵素活性を予測することが可能なことが確認された。これより薬剤代謝の異常を検査することが可能であることが示された。さらに、エキソン5領域以外のエキソン1～4の領域の変異を合わせて検出することにより、より効果的に薬剤代謝の異常を検査できることが示された。

【0034】

(表1) DNAチップでの解析結果と対応する遺伝子組換えUGT1A1分子のUGT活性

【0035】

【表1】

UGT遺伝子変異	相対UGT活性(グルクロン抱合活性)
正 常	100%
G71R (ホモ)	32%
G71R (ヘテロ)	60%
P229Q (ヘテロ)	15%
Y486D (ホモ)	8%
Y486D (ヘテロ)	36%

【0036】

【実施例4】

実施例1と同様に操作してエキソン5領域の変異を検出したUGT1A6分子について、エキソン5領域の変異の解析結果と、対応するその遺伝子組換えUGT1A6分子のUGT活性を2-アミノ-5-ニトロ-4-トリフルオロメチルフェノールを基質として測定した。その結果を表2に示した。

【0037】

(表2) DNAチップでの解析結果と対応する遺伝子組換えUGT1A6分子のUGT活性

【0038】

【表 2】

UGT遺伝子変異	相対UGT活性(グルクロン結合活性)
正 常	100%
Y485D (ホモ)	>1%

【0039】

この結果、UGT1A1のみならず、他のアイソフォームの変異も本発明の方法で検出可能であることが判り、本発明の効果が確かめられた。

【0040】

【発明の効果】

以上説明したように、本発明のUGT1をコードする共通エキソン領域の変異を検出方法により、多数の存在するアイソフォームを個別に検査することなく、効率的にUGT1遺伝子の変異を検出して、数多い薬剤に対してその代謝の判定、予測および検査を効率的に行うことができる。

【0041】

【図面の簡単な説明】

【図1】

DNAチップの核酸プローブの配置を示した図である。

【図2】

試料1（正常検体）の検査結果を表した図である。

【図3】

試料2の検査結果を表した図である。

【図4】

試料3の検査結果を表した図である。

【図5】

試料4の検査結果を表した図である。

【図6】

試料5の検査結果を表した図である。

【図7】

試料6の検査結果を表した図である。

【図8】

試料 7 の検査結果を表した図である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Shiga University of Medical Science

<120> Method for detection of mutation in UGT Gene

<130> NP02-1074

<140>

<141>

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed DNA
based on UGT1 gene

<400> 1

tggtaccagn accattcct

19

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed DNA
based on UGT1 gene

<400> 2

tcagagacng agcatttt

18

<210> 3

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed DNA
based on UGT1 gene

<400> 3

taattcccng tatgaaa

17

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed DNA
based on UGT1 gene

<400> 4

ctgcagcaga ggggacatga

20

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed DNA
based on UGT1 gene

<400> 5

aacattatgc ccgagactaa c

21

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed DNA
based on UGT1 gene

<400> 6

caacccattc tcctacgtg

19

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed DNA
based on UGT1 gene

<400> 7

agatgcagag ctcaataggt c

21

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed DNA
based on UGT1 gene

<400> 8

gctggacctg gcagtgttc

19

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed DNA
based on UGT1 gene

<400> 9

tttccggtag ccatatgcac a

21

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed DNA
based on UGT1 gene

<400> 10

ccgcagccca cgacctcacc tggt

24

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed DNA
based on UGT1 gene

<400> 11

agaggaaacc aatcacgtcc aagg

24

【書類名】 図面

【図 1】

G71R				P229Q				Y486D			
A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T
●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

【図 2】

G71R				P229Q				Y486D			
A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T
●	●	○	●	●	○	●	●	●	●	●	○
●	●	○	●	●	○	●	●	●	●	●	○
●	●	○	●	●	○	●	●	●	●	●	○
●	●	○	●	●	○	●	●	●	●	●	○
●	●	○	●	●	○	●	●	●	●	●	○

● : ハイブリダイズ無し ○ : ハイブリダイズ有り

【図 3】

G71R				P229Q				Y486D			
A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T
○	●	○	●	●	○	●	●	●	●	●	○
○	●	○	●	●	○	●	●	●	●	●	○
○	●	○	●	●	○	●	●	●	●	●	○
○	●	○	●	●	○	●	●	●	●	●	○
○	●	○	●	●	○	●	●	●	●	●	○

● : ハイブリダイズ無し ○ : ハイブリダイズ有り

【図 4】

G71R				P229Q				Y486D			
A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T
○	●	○	●	●	○	●	●	●	●	●	○
○	●	○	●	●	○	●	●	●	●	●	○
○	●	○	●	●	○	●	●	●	●	●	○
○	●	○	●	●	○	●	●	●	●	●	○
○	●	○	●	●	○	●	●	●	●	●	○

● : ハイブリダイズ無し ○ : ハイブリダイズ有り

【図 5】

G71R				P229Q				Y486D			
A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T
○	●	●	●	●	○	●	●	●	●	●	○
○	●	●	●	●	○	●	●	●	●	●	○
○	●	●	●	●	○	●	●	●	●	●	○
○	●	●	●	●	○	●	●	●	●	●	○
○	●	●	●	●	○	●	●	●	●	●	○

● : ハイブリダイズ無し ○ : ハイブリダイズ有り

【図 6】

G71R				P229Q				Y486D			
A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T
●	●	○	●	○	○	●	●	●	●	●	○
●	●	○	●	○	○	●	●	●	●	●	○
●	●	○	●	○	○	●	●	●	●	●	○
●	●	○	●	○	○	●	●	●	●	●	○
●	●	○	●	○	○	●	●	●	●	●	○

● : ハイブリダイズ無し ○ : ハイブリダイズ有り

【図 7】

G71R				P229Q				Y486D			
A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T
●	●	○	●	●	○	●	●	●	●	○	○
●	●	○	●	●	○	●	●	●	●	○	○
●	●	○	●	●	○	●	●	●	●	○	○
●	●	○	●	●	○	●	●	●	●	○	○
●	●	○	●	●	○	●	●	●	●	○	○

● : ハイブリダイズ無し ○ : ハイブリダイズ有り

【図 8】

G71R				P229Q				Y486D			
A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T
●	●	○	●	●	○	●	●	●	●	○	●
●	●	○	●	●	○	●	●	●	●	○	●
●	●	○	●	●	○	●	●	●	●	○	●
●	●	○	●	●	○	●	●	●	●	○	●
●	●	○	●	●	○	●	●	●	●	○	●

● : ハイブリダイズ無し ○ : ハイブリダイズ有り

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明の課題は U G T をコードする遺伝子の変異を有効的に検出することにより、薬剤代謝の判定、予測又は検査方法を提供することである。

【解決手段】 U G T をコードする遺伝子が 5 個のエキソンから成り、エキソン 2 ～ 5 領域は U G T 1 のアイソフォーム毎に共通の領域であることから、共通領域の変異、とりわけエキソン 5 領域の変異を検査し、さらに複数のエキソン領域の変異検出を加えることにより、効果的な U G T 1 遺伝子の変異を検査する。変異検査の手段としては、核酸プローブを用いた核酸チップが用いられる。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-235029
受付番号	50201201215
書類名	特許願
担当官	塩野 実 2151
作成日	平成14年 9月25日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年 8月12日
-------	-------------

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[502292732]

1. 変更年月日	2002年 8月12日
[変更理由]	新規登録
住 所	滋賀県大津市瀬田月輪町
氏 名	滋賀医科大学長